

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790961

研究課題名（和文） 免疫膺活化による慢性ウイルス感染症の治療

研究課題名（英文） Therapy for the chronic viral infection by activating the immune system

研究代表者

平田 雄一 (HIRATA YUICHI)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：50439452

研究成果の概要（和文）：

慢性 HBV 感染症の実験モデルとして樹立した HBV-Tg マウスにおいて NKT 細胞を活性化する Galactosylceramide が抗ウイルス効果を示すことを明らかにした。また、HBV を慢性感染させたヒト肝臓型キメラマウスにおいて、肝細胞特異的 DDS で修飾した polyIC が自然免疫を活性化させ抗ウイルス効果を示すことを明らかにした。これらの結果は HBV 慢性感染症において、自然免疫の賦活化が新たな治療法となる可能性を示していた。

さらに、次世代シーケンサーを使用した遺伝子発現解析から、HBV 感染により肝臓で産生される免疫担当細胞維持に必須な液性因子が抑制されることを見出した。HBV 感染による液性因子の発現低下により肝臓内の免疫担当細胞がアポトーシスをおこし減少していた。この研究成果は、HBV による免疫寛容成立の新たなメカニズムの可能性を示唆するものであり、HBV に対する新たな治療法開発の可能性を示していた。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that galactosylceramide, the activator of NKT cells, has an antiviral effect in HBV-Tg mice established as the experimental model for the chronic HBV infection. We also showed that polyIC with hepatotropic properties activates innate immune response, resulting in antiviral effect in HBV-infected chimeric mice with human livers. These results suggest the possibility that activation of innate immune response leads to the novel therapeutic approaches against the chronic HBV infection.

Further, we found that chronic HBV infection suppresses humoral factors from livers which are essential for maintaining immune cells by gene expression analysis using the next generation sequencer. This suppression of humoral factors caused the apoptosis of immune cells in livers. This result suggests the new mechanism of the chronicity of HBV infection, which leads to invent the new therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
2011 年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
総計	3,000,000 円	900,000 円	3,900,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：治療ワクチン、B型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

肝炎ウイルスやヘルペスウイルスのように免疫寛容を起こし、慢性感染症となるウイルスが存在する。免疫寛容は特定抗原に対する免疫反応の欠如・抑制状態と定義されるが、ウイルス抗原に対して免疫寛容となり慢性感染が成立するメカニズムは分かっておらず、それゆえウイルスを排除する効果的な治療法はない。B型肝炎ウイルス (HBV) は、肝細胞を宿主として慢性感染症を起こし、慢性肝炎・肝硬変、さらには肝細胞癌を引き起こす。HBVは免疫の不完全な乳児期は慢性化するが、成人では排除されることが知られている。これは免疫寛容を破綻させることが治療につながる (免疫療法) ことを示している。そこで我々は、慢性感染症における免疫寛容と破綻のメカニズムを解析し、そこからウイルスを排除する方法を検討するツールとして HBV に着目した。

2. 研究の目的

慢性感染症に対する免疫療法の開発を目指す。そのモデルとして HBV における免疫寛容の成立と破綻のメカニズムを解析し、さらには免疫賦活化による HBV の治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

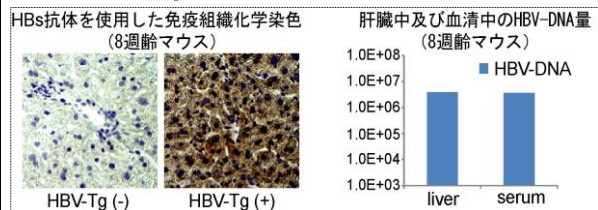
慢性感染症のモデルとして HBV に着目し解析を行った。HBV 感染動物モデルである HBV 感染ヒト肝臓型キメラマウスでは、ヒト肝細胞の持つ自然免疫と HBV の解析が可能であった。しかし、SCID マウスであり、獲得免疫の解析は困難であった。そこで我々は慢性 HBV 感染症のモデル動物として HBV ゲノムを組み込んだ遺伝子改変マウス (HBV-Tg マウス) を作成した。本マウスでは、自然免疫・獲得免疫が施錠であるため、これら免疫システムと慢性 HBV 感染症の関係を解析することが可能となった。本研究では、これらマウス利点を生かし解析を行った。

また、免疫賦活化するツールとして、NKT を活性化する galactosylceramide, polyIC に肝特異的 DDS を修飾したものを使用した。さらに、細胞性免疫・液性免疫を強力に誘導できる組換えワクチニアウイルスの作製を試みた。

4. 研究成果

HBV ゲノムを組み込んだ遺伝子改変マウス (HBV-Tg マウス) を作成した。このマウスは、胎生期より HBV 蛋白質を発現しているため免疫寛容状態になっている。実際、HBV-DNA 及び HBV 蛋白質は排除されず持続的に発現していた (図 1 参照)。

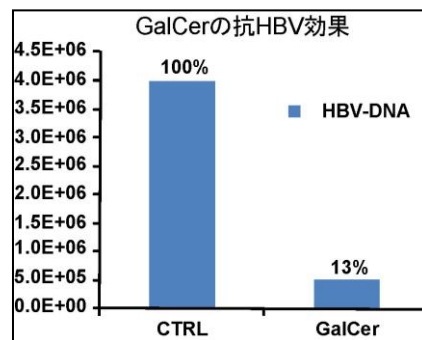
図 1. HBV-Tg マウスにおける発現確認



さらに、本マウスは肝臓にて炎症像を認め、やがて肝硬変、肝細胞癌を引き起こし、ヒトでの慢性 HBV 感染症の病態に類似していた。

本マウスに NKT 細胞を活性化する galactosylceramide を投与し抗 HBV 効果を評価した。すると、galactosylceramide 投与により NKT 細胞が活性化され、肝臓内 HBV-DNA 量の低下を認めた (図 2 参照)。

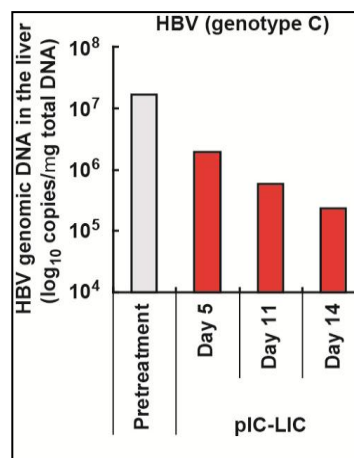
図 2. Galactosylceramide の抗 HBV 効果



しかしながら、その効果は持続せず時間とともに減少した HBV-DNA 量が回復してしまうことが判明した。

次に、polyIC に肝特異的 DDS を修飾したもの (pIC-LIC) を HBV 感染ヒト肝臓型キメラマウスに投与した。すると、ヒト肝細胞の自然免疫を活性化し IFN- λ を強力に産生させることにより抗 HBV 効果を示すことが明らかとなった (図 3 参照)。

図 3. pIC-LIC の抗 HBV 効果



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Konishi H., Okamoto K., Ohmori Y., Yoshino H., Ohmori H., Ashihara M., Hirata Y., Ohta A., Sakamoto H., Hada N., Katsume A, Kohara M., Morikawa K., Tsukuda T., Shimma N., Foster GR., Alazawi W., Aoki Y., Arisawa M., Sudoh M. An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication. *Sci Rep.*, 査読あり, 2012;2:259.
- ② 平田雄一、小原道法：ヒト肝細胞での自然免疫応答における interferon- λ の重要性 肝胆膵、査読なし、2011, 63, 1087-1094
- ③ Satoh M, Saito M, Takano T, Kasama Y, Nishimura T, Nishito Y, Hirata Y., Arai M, Sudoh M, Kai C, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1. *J Infect Dis.*, 査読あり, 2011 Oct 15;204(8):1172-80.
- ④ Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Hayashi M., Hirata Y., Satoh M., Tateno C., Hayashi Y., Hishima T., Funata N., Sudo M., Kohara M. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. *J. Hepatology*, 査読あり, 2011, 55:512-521
- ⑤ Weng L., Hirata Y., Arai M., Kohara M., Wakita T., Watashi K., Shimotohno K., He Y., Zhong J., Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J Virol.*, 査読あり, 2010, 84(22), 11761-70.
- ⑥ 平田雄一、小原道法：スフィンゴ脂質合成阻害薬の C 型肝炎ウイルスに対する薬理作用 肝胆膵、査読なし、2010、61 (増刊号)、216-222

[学会発表] (計 8 件)

- ① Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of

the Liver Disease, 2011.11.4-8, San Francisco, USA

- ② 平田雄一、井上和明、小原道法：ヒト肝細胞での自然免疫応答における IFN- λ の重要性とその誘導メカニズム 第 19 回 消化器病学会関連週間 (JDDW2011)、2011.10.20-23、福岡
- ③ Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. Suppression of sphingomyelin augmented by hepatitis C virus has robust anti-viral effects in human livers. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.11-16, Sapporo, Japan
- ④ Hirata Y., Nakagawa S., Tokunaga Y., Tanaka Y., Mizokami M., Inoue K., Kohara M. A Interferon lambda plays a critical role on antiviral response by hepatotropic inducer of innate immunity in human hepatocyte. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, 2010.10.29-11.2, Boston, USA
- ⑤ 平田雄一、須藤正幸、小原道法：スフィンゴ脂質合成阻害剤の抗 HCV 薬理作用 第 18 回 消化器病学会関連週間 (JDDW2010)、2010.10.13-16、横浜
- ⑥ 平田雄一、井上和明、小原道法：IFN λ を強力に誘導する核酸/リポソーム製剤の同定とその抗 HCV 効果 第 18 回 消化器病学会関連週間 (JDDW2010)、2010.10.13-16、横浜
- ⑦ Hirata Y., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., and Kohara M. : A newly synthesized serine palmitoyltransferase inhibitor, NA808, has a robust antiviral effect to hepatitis C virus via hindering host-virus interactions. The 17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, 2010.9.10-14, Yokohama
- ⑧ Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M. : Hepatitis C virus altered the sphingolipids metabolism for better environment on its replication. KEYSTONE SYMPOSIA Bioactive Lipids, 2010.6.6-11, Kyoto

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 平田 雄一 (HIRATA YUICHI)
財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医
科学研究分野・研究員
研究者番号：50439452

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし